

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870040

研究課題名（和文） シロイヌナズナ CLV3 シグナル伝達系における細胞内シグナリングの解析

研究課題名（英文） Functional analysis on CLV3 intracellular signaling in Arabidopsis

研究代表者

木下 温子 (KINOSHITA ATSUKO)

独立行政法人理化学研究所・生長制御研究グループ・基礎科学特別研究員

研究者番号：00612079

研究成果の概要（和文）：

CLV3 シグナル伝達系の下流で機能する細胞内シグナリングの分子メカニズムを明らかにするために、合成 CLV3 ペプチドを用いたサプレッサースクリーニングを行った。その結果得られた変異体 *cli2* について、遺伝学的・分子生物学的・生化学的解析を行い、CLV3 シグナル伝達系の下流で機能する分子メカニズムの一端を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

In order to identify novel molecular components operating in the CLV3 signaling pathway, I have performed mutational screens for insensitivity to synthetic CLV3 peptide. Genetic, molecular and biochemical analyses of *cli2* revealed a part of intracellular signaling downstream of CLV3.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ・シグナル伝達・メリステム・ペプチドホルモン

1. 研究開始当初の背景

CLAVATA (*CLV*) *3* は、高等植物のモデル植物であるシロイヌナズナにおいて、茎頂分裂組織の肥大化や花器官数の増大など、地上部に顕著な表現型をもたらす *clv* 変異体の原因遺伝子として単離された。その遺伝子産物は、わずか 96 アミノ酸からなる低分子の分泌性

タンパク質であり、C 末には保存された 14 アミノ酸の CLE ドメインを有している。これまでの遺伝学的解析から、シロイヌナズナの茎頂分裂組織において、分泌性のペプチドリガンドである CLV3 が、leucine-rich repeat (LRR) 型受容体様キナーゼである CLV1、あるいは LRR 型受容体様タンパク質である CLV2

によって受容される、細胞非自立的なシグナル伝達系が重要であることが明らかにされてきた。さらに、これらの受容体の下流では、ホメオドメイン型転写因子である *WUSCHEL* (*WUS*) の発現が抑制され、一方で *WUS* は *CLV3* の発現を促進することから、*CLV3* と *WUS* の間には負のフィードバック機構が成立すると考えられている。また、近年の解析結果から、LRR 型受容体様キナーゼの一種である RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE (RPK) 2 が、*CLV1*、*CLV2* のいずれとも独立に機能する、*CLV3* シグナル伝達系の第三の受容体経路であることが明らかになった。

このように、*CLV3* の受容機構や、シグナルに応答した遺伝子発現制御が明らかにされているものの、*CLV3* の受容後に引き起こされる細胞内のシグナリング経路に関しては、ごくわずかな知見しか得られていなかった。

2. 研究の目的

CLV3 の成熟型、および受容機構については近年次々に知見が得られているのに対し、*CLV3* の受容後に引き起こされる細胞内シグナリング経路に関しては、mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードや、POLYMERASE (POL) をはじめとする複数のホスファターゼの関与が報告されているものの、その詳細な分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。また、*CLV3* のシグナルを伝達する3つの受容体経路に関しても、これらが完全に冗長であるのか、あるいはそれぞれの受容体に固有な機能があるのか、依然として不明のままであり、この問題を解明するためにも、受容体の直下で機能する細胞内シグナリングの構成因子を明らかにすることが急務の課題であると考えられる。

そこで、本研究では *CLV3* の下流で機能する新規因子を同定し、その機能解析から *CLV3* シグナル伝達系の下流で働く細胞内シグナリングの分子機構を明らかにすることを目標として解析を行う。

3. 研究の方法

CLV3 の下流で機能する新規因子を同定するため、合成 *CLV3* ペプチドを用いたサブレッサースクリーニングを行う。スクリーニングで得られた変異体 *cli2* について遺伝学的・分子生物学的・生化学的解析を行うことにより、細胞内シグナリングの一端を明らかにする。

(1) *CLV3* シグナル伝達系における *CLI2* の機

能解析

① *cli2* 変異体の表現型解析

CLV3 シグナル伝達系における *CLI2* の機能を明らかにするため、*cli2* 変異体の表現型解析を行う。特に、茎頂・根端分裂組織について、その表現型を定量的に評価する。

② *cli2* 変異体の原因遺伝子探索

cli2 の表現型をもたらす原因遺伝子を探索するため、マップベースクローニング、およびシーケンス解析を行う。さらに、変異の見つかった遺伝子のゲノム断片を用いて相補性検定を行い、原因遺伝子を特定する。

③ *CLI2* の局在解析

CLI2 の組織レベル、細胞内レベルでの局在を明らかにするため、*in situ* mRNA hybridization、GUS レポーターラインの作出、および GFP-*CLI2* 融合タンパク質の作出を行う。GFP-*CLI2* 融合タンパク質は、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターの下流で過剰発現させ、*Nicotiana benthamiana* 葉の一過的発現系で発現解析を行う。

(2) *CLI2* 相互作用因子の探索

① 受容体様キナーゼとの相互作用解析

先行研究の事例から、*CLI2* は受容体様キナーゼの細胞内ドメインと相互作用する可能性が推察される。そこで、キナーゼドメインを持ち、かつ *CLV3* の下流で機能することが遺伝学的に示されている3つのタンパク質 *CLV1*、*CRN/SOL2*、*RPK2* と、*CLI2* とのタンパク質間相互作用をそれぞれ検証する。タンパク質間相互作用の検出には、出芽酵母を用いた yeast two-hybrid system と、*Nicotiana benthamiana* の葉における一過的発現系を用いた免疫沈降実験の2種類の手法を使用する。

② *CLI2* 結合タンパク質の探索

CLI2 と相互作用する因子を網羅的に探索するため、*CLI2* を bait とした yeast two-hybrid スクリーニングを行う。*CLI2* と相互作用する因子が得られた場合、*CLI2* タンパク質の deletion series により同様の実験を行い、結合部位を特定する。

4. 研究成果

(1) CLV3シグナル伝達系におけるCLI2の機能解析

① *cli2*変異体の表現型解析

*cli2*変異体の3つのアレルについて、表現型を詳細に観察した。その結果、*cli2*変異体では茎頂および根端分裂組織が野生型に比べ肥大化していることが明らかになった(図1)。さらに、幹細胞数の異常や、分裂組織特異的マーカー遺伝子の異所的発現など、様々な形態異常が観察された。以上の観察結果より、*CLI2*は茎頂および根端分裂組織において、幹細胞のアイデンティティを制御する機能を持つことが示唆された。

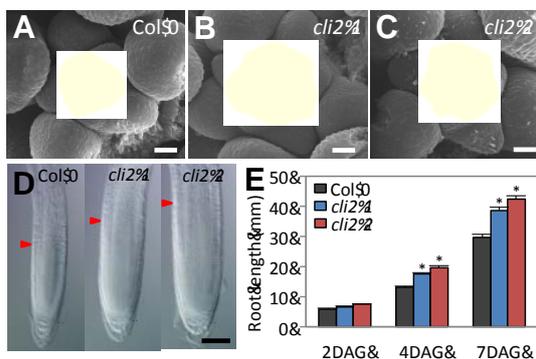


図1. *cli2*変異体の表現型

(A-C) 野生型 (A)、及び *cli2* 変異体の茎頂分裂組織 (黄色)。(D) 野生型、および *cli2* 変異体の根端分裂組織。赤矢尻は根端分裂組織の領域を示す。(E) 播種後 2、4、7 日後における、野生型および *cli2* 変異体の主根長。スケールバー ; 20 μ m (A-C)、100 μ m (D)。

② *cli2*変異体の原因遺伝子探索

マップベースクローニング、およびシークエンス解析の結果、*cli2*変異体は植物特異的なU-boxタンパク質に変異を持つことが明らかとなった。さらにこの遺伝子のゲノム断片を用いて相補性検定を行ったところ、*cli2*の表現型が相補された。以上の結果から、*CLI2*の原因遺伝子はU-boxタンパク質であることが示された。

③ *CLI2*の局在解析

in situ mRNA hybridization、およびGUSレポーターラインの発現解析の結果、*CLI2*遺伝子は茎頂分裂組織、根端分裂組織、葯などで発現することが明らかとなった。さらに、GFP-*CLI2*融合タンパク質の観察結果から、*CLI2*は細胞質に局在することが明らかとなった(図2)。

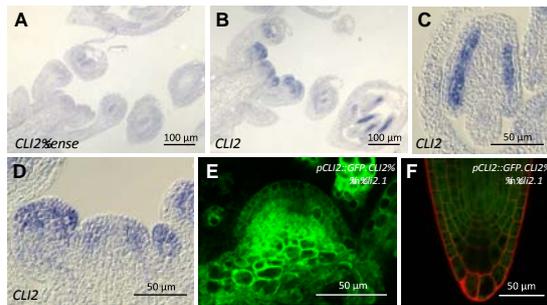


図2. *CLI2*の局在

(A) *in situ* mRNA hybridizationによる*CLI2* mRNAの検出。*CLI2*sense (A)、antisense (B-D) プローブを用いた場合。葯 (C) および茎頂分裂組織 (D) で発現が見られる。(E, F) *pCLI2::GFP::CLI2* 形質転換体の、茎頂分裂組織 (E) および根端分裂組織 (F) におけるGFPタンパク質局在解析結果。

(3) *CLI2*相互作用因子の探索

③ 受容体様キナーゼとの相互作用解析

CLV1、CRN/SOL2、RPK2の細胞内ドメインと*CLI2*とのタンパク質間相互作用をyeast two-hybrid systemを用いて検証したところ、いずれのタンパク質の組み合わせにおいても酵母の生育は観察されなかった。さらに、*Nicotiana benthamiana*の葉における一過的発現系を用いた免疫沈降実験においても、*CLI2*はいずれのタンパク質とも共沈が見られなかった。これらの結果より、受容体様キナーゼCLV1、CRN/SOL2、RPK2は*CLI2*の直接の標的タンパク質ではないことが示唆された。

④ *CLI2*結合タンパク質の探索

*CLI2*をbaitとしたyeast two-hybridスクリーニングの結果、得られた候補プラスミド35クローンのうち17クローンが同じファミリーに属するタンパク質をコードしていた。この*CLI2*相互作用因子は細胞質、および核に局在していることがGFP融合タンパク質の観察結果から明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Replogle A, Wang J, Paolillo V, Smeda J, Kinoshita A, Durbak A, Tax FE, Wang X, Sawa S, Mitchum MG. "Synergistic interaction of CLAVATA1, CLAVATA2, and RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 in cyst nematode parasitism of

Arabidopsis.” Mol Plant Microbe Interact. 査読有, 2013 ; 26 (1): 87-96. doi: 10.1094/MPMI-05-12-0118-FI.

(3)連携研究者
なし

〔学会発表〕(計4件)

- ① Atsuko Kinoshita “*CLL2* is involved in stem cell maintenance in the SAM and the RAM” The 4th NIBB-MPIPZ-TLL Symposium, 2012年11月20日, 愛知
- ② 木下温子、田畑亮、志水法子、山田昌史、重信秀治、山口勝司、長谷部光泰、福田裕穂、神谷勇治、澤進一郎「シロイヌナズナ新規CLV3ペプチド耐性変異体 *cli2* の表現型解析」日本植物学会第76回大会、2012年9月16日、兵庫
- ③ Atsuko Kinoshita, Yusuke Jikumaru, Yumiko Takebayashi, Hiroo Fukuda, Shinichiro Sawa and Yuji Kamiya “Possible crosstalk between phytohormone and CLV3/CLE peptide signaling pathway in Arabidopsis” 23rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2012), 2012年7月4日, Vienna, Austria
- ④ 木下温子, 別役重之, 福田裕穂, 澤進一郎 「茎頂分裂組織における細胞分裂活性の統合的制御」日本植物学会第75回大会、2011年9月18日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木下 温子 (KINOSHITA ATSUKO)

独立行政法人理化学研究所・生長制御研究グループ・基礎科学特別研究員

研究者番号：00612079

(2)研究分担者

なし